FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1966

THÈSE 481

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Gérard, Pierre Charles DUFOORT

Né le 20 Août 1934, à DUNKERQUE

Présentée et soutenue publiquement le

DESCRIPTION ET ETUDE D'UNE METHODE DE DOSAGE DIRECT DES ESTERS DU CHOLESTEROL SERIQUE PAR VOIE AUTOMATIQUE

Président : Monsieur J. POLONOVSKI Professeur)

DACTYLO-SORBONNE

8, Rue Casimir-Delavigne

PARIS-VI^e^

1966

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

-:-

Année 1966 N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Gérard, Pierre, Charles DUFOORT

Né le 20 août 1934 à DUNKERQUE

-:-

Présentée et soutenue publiquement
le

-:-

DESCRIPTION ET ETUDE D'UNE METHODE DE DOSAGE DIRECT DES ESTERS DU CHOLESTEROL SERIQUE PAR VOIE AUTOMATIQUE

-:-

Président : Monsieur J. POLONOVSKI (Professeur)

-:-

DACTYLO-SORBONNE
8, rue Casimir Delavigne
PARIS
1966

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK
- LEIDEN -

PROFESSEURS HONORAIRES

MM ALAJOUANINE (T), AUBIN (A), BENARD (H), BINET (L), BULLIARD (H), CATHALA (J), CHABROL (E), CHAILLEY-BERT (P), DEBRE (R), FEY (B), GALLIARD(H), GAUDART d'ALLAINES (F. de), GENNES (L. de), HALPHEN (E), HAZARD (R), HEUYER (G), LAROCHE (G), LAVIER (G), LELONG (M), LEVY-SOLAL (E), LIAN (C), MARCHAL (G), MATHIEU (P), MONOD (R), MOREAU (R), MOULONGUET (P), PASTEUR VALLERY-RADOT (P), PETIT-DUTAILLIS (D), PIEDELIEVRE (R), QUENU (J), RENARD (G), RICHET (C), SENEQUE (J), STROHL (A), TANON(L), VERNE (J).

DOYEN ..... M BROUET (G)

1er assesseur ..... M BARGETON (D)
2ème assesseur ..... M GOSSET (J)

I - PROFESSEURS

1°- CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires

	MM
Anatomie	DELMAS (A)
Anatomie pathologique	DELARUE (J)
Anesthésiologie	BAUMANN (J)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J)
Biologie médicale	FAUVERT (R)
Biophysique médicale	BUGNARD (L) DOGNON (A) DJOURNO (A)
Cancérologie médicale et sociale	N...
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G)
Embryologie	TUCHMANN (H)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	N ...
Histologie	GIROUD (A)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J)
Médecine du Travail	DESOILLE (H)
Médecine légale	DEROBERT (L)

	MM
Microbiologie (bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G) KUSS (R)
Pathologie exotique	N ...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.) BRICAIRE (H)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J)
Pathologie et thér. générales	N...
Pharmacologie	CHEYMOL (J) LEVY (Mlle J)
Physiologie	BARGETON (D) PARROT (J)
Physiologie et path. obstétricales	LEPAGE (F)
Radiologie médicale	DESGREZ (H)
Techn. chir. et Chirurgie exp.	CAUCHOIX (J)
Thérapeutique	CONTE (M)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M)

b) Professeurs à titre personnel

Anatomie anthropologique	OLIVIER (G)
Anatomie pathologique	NEZELOFF (Ch)
Bactériologie	BARBIER (P)
Biochimie médicale	DESGREZ (P) DREYFUS (J.Cl.) POLONOVSKI (J)
Biologie médicale	BOURLIERE (F)
Histologie	COUJARD (R)
Pathologie expérimentale	LOEPER (J)
Physiologie	DEJOURS (P) SCHERRER (J)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L) GOUGEROT (L)
Radiologie médicale	FISCHGOLD (H)

2°- CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires

	MM
Clinique carcinologique chirurgicale	REDON (H)
Clinique cardiologique Broussais	SOULIE (P)
Clinique cardiologique Boucicaut	LENEGRE (J)

		MM
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB(J.L.)
	Cochin	LEGER (L)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J)
	Pitié	N...
	Saint-Antoine	GOSSET (J)
	Salpêtrière	SICARD (A)
	Tenon	OLIVIER (Cl)
Clin. de chir. infant. et orth.		FEVRE (M)
Clin. chir. orth. et traumat.		MERLE d'AUBIGNE (R)
Clin. de chir. cardio-vasculaire		DUBOST (Ch)
Clin. de chir. pleuro-pulmonaire		MATHEY (J)
Clin. dermatologique		DUPERRAT (F)
Clin. endocrinologique		DECOURT (J)
Clin. de génétique médicale		LAMY (M)
Clinique gynécologique		HUGUIER (J)
Clin. des maladies cut. et syphil.		DEGOS (R)
Clin. des maladies des enfants		TURPIN (R)
Clin. des maladies infectieuses		MOLLARET (P)
Clin. des maladies ment. et de l'encéph.		DELAY (J)
Clin. des maladies métaboliques		HAMBURGER (J)
Clinique des maladies du sang		BERNARD (J)
Clinique des mal. du système nerveux		CASTAIGNE (P)
Cliniques médicales	Bicêtre	DEPARIS (M)
	Broussais	MILLIEZ (P)
	Cochin	BROUET (G)
	Hôtel-Dieu	BARIETY (M)
	Lariboisière	SEZE (S. de)
	Pitié	DREYFUS (G)
	Saint-Antoine	KOURILSKY (R)
	Saint-Antoine	BOUDIN (G)
Clin. d'hyrologie et de climatologie		DEBRAY (Ch)
Clin. méd. infant. et pédiatrie soc.		MARIE (J)
Clinique médicale propédeutique		JUSTIN-BESANÇON(L)
Clin. méd.-soc. du diabète sucré et des maladie de la nutrition		DEROT (M)
Clinique de neuro-chirurgie		DAVID (M)
Clinique neurologique		GARCIN (R)
Cliniques obstétricales	Baudelocque	LACOMME (M)
	Saint-Antoine	MERGER (R)
Clin. obst. et gynécologique		VARANGOT (J)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)		OFFRET (G)
Clinique ophtalmologique (Cochin)		N...

	MM
Clinique oto-rhino-laryngologique	AUBRY (M)
Clinique de pédiatrie et de puéricul.	THIEFFRY (S)
Clinique de pneumo-phtisiologie	BERNARD (E)
Clin. de neuro-psychiatrie infantile	MICHAUX (L)
Clin. de rhumatologie méd. et soc.	COSTE (F)
Clinique stomatologique	DECHAUME (M)
Clin. thérapeutique chirurgicale	ROUX (M)
Clinique thérapeutique médicale	LEMAIRE (A)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M)
Clinique urologique	ABOULKER (P) COUVELAIRE (R)
Clin. chirur. orth. et traumatologique	PADOVANI (P)
Hygiène et clinique de la première enfance	LAPLANE (R)
Séméiologie médicale — A. Chantin	DOMART (A)
Séméiologie médicale — Pitié	RAMBERT (P)
Séméiologie médicale — Rothschild	WOLFROMM (R)
Séméiologie et clinique chirurgicales	POILLEUX (F)
Séméiologie traumatique et orthopédique	JUDET (R)

b) Professeurs à titre personnel

Hématologie	ANDRE (R) BOUSSER (J)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A)
Maladies infectieuses	BASTIN (R)
Médecine	AZERAD (E) BOUR (H) GROSSIORD (A) LAMBLING (A) PEQUIGNOT (H) PERRAULT (M) SIGUIER (F) WORMS (R)
Neurologie	LHERMITTE (F)
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P)
Oto-rhino-laryngologie	MADURO (R)
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B) MEYER (A)
Rhumatologie	DELBARRE (F)

II - PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM
Anatomie	CABROL (C)
Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch)

MM

Anesthésiologie ..... VOURC'H (G)
Bactériologie ..... CHRISTOL (D)
Biochimie médicale ..... CARTIER (P), GONNARD (P)
Biologie médicale ..... HARTMANN (L)
Physique médicale ..... GREMY (F), ROUCAYROL (J.C.)

III - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie ..... HAUDUROY (P) Pr. s.ch.
Pathologie chirurgicale ..... RUFLER (J) Pr. s. ch.

Secrétaire général de la Faculté ..... M LENA (J)
Conseillers administratifs ..... Mlle CHAINTREUIL(G), M FAYE (R)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque, Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine ..... M le Docteur HAHN (A)
Conservateurs ..... Mlles DUMAITRE (P), LE NOIR (G), QUIEVREUX (E)
Bibliothécaires ..... Mmes CONTET (J), FORGET (F), Mlles DUROZOY(M.F.), LAURENT (H), Dr SCHILLER (J)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, L'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546003_0072

A mes Parents

Humble témoignage de
ma profonde affection

A tous les Miens

A notre Maître

Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI

Professeur de Biochimie médicale à
la Faculté de Médecine de Paris
Docteur ès-Sciences

Qui a bien voulu nous
faire le grand honneur
d'accepter la présidence
de cette thèse

En témoignage de notre
respectueuse reconnais-
sance

A mon Maître

Monsieur le Docteur Louis MOLINE

Médecin biologiste
Chef du Laboratoire de l'Hôpital
de Lagny

Qui m'a inspiré le sujet
de cette thèse et qui
a bien voulu m'accorder
sa confiance et son
amitié

Ce modeste témoignage de
gratitude et d'attache-
ment

DESCRIPTION ET ETUDE D'UNE METHODE DE DOSAGE DIRECT DES ESTERS DU CHOLESTEROL SERIQUE PAR VOIE AUTOMATIQUE

-:-:-

Depuis quelques années le dosage du cholestérol total sérique est possible par voie automatique.

L'Auto-analyseur de la Compagnie Technicon a été d'abord utilisé pour mesurer la coloration de Zak et Zlatkis (1) après extraction manuelle des lipides. Il s'agissait d'une méthode semi automatique qui utilisait l'alcool isopropylique comme solvant d'extraction.

La plupart des utilisateurs lui préfèrent la méthode de PEARSON que BOY (2) a adapté au mécanisme standard de l'auto analyseur. Malgré la différence de densité de ses composants, le réactif est stable, homogène mais ne peut être aspiré et refoulé que dans des tubes en acidflex. Cette substance supporte sans dommage la corrosion acide mais sa résistance mécanique est faible. Les tubes serpentent sous les rouleaux de la pompe ce qui perturbe rapidement le dosage.

En 1963, ETIENNE, PAPIN et RENAULT (3) ont publié une adaptation à l'auto analyseur de la méthode de HUANG. Le réactif de Huang (4) est fort simple, il est consitué par un mélange d'anhydride et acide acétique, d'acide sulfurique stabilisé par le sulfate de sodium anhydre. Au réfrigérateur, sa conserva-

tion est excellente sans excéder toutefois une durée d'un mois. L'avantage de cette méthode est d'utiliser le matériel habituel de l'auto analyseur et les tubes de pompe en Tygon, qui résistent au réactif pendant un certain temps. Le Tygon finit cependant par durcir. Il est facile d'apprécier ce durcissement et de changer les tubes lorsque leur élasticité n'est plus correcte.

Notre travail a été effectué par cette dernière méthode (LIEBERMANN HUANG). Nous avons utilisé avec très peu de modification le montage préconisé dans l'article d'ETIENNE, PAPIN et RENAULT, publié dans les Annales de biologie clinique.

L'utilisateur est en présence de deux méthodes dont la valeur est identique au point de vue des résultats obtenus. Il s'agit dans les deux cas de méthode directe sans extraction lipidique préalable. Les protéines du sérum précipitent par acidification puis se redissolvent par échauffement à la température de 65-70°.

Ces méthodes directes donnent des résultats intéressants et comparables avec la méthode de SPERRY et WEBB qui est souvent prise comme référence.

Au cours de ce travail, nous avons constaté que les taux de cholestérol total, que l'on pouvait obtenir par chromatographie sur colonne d'alumine en faisant la somme des fractions libre et estérifié, étaient tout à fait superposables aux résultats de la méthode de HUANG par l'auto analyseur.

Il est évident que les méthodes directes donnent les mêmes résultats que les méthodes

s'accompagnant d'extraction lipidique dans la mesure où il s'agit de sérum clair. Nous avons établi un tableau précis de correction pour les sérums chargés en bilirubine. Nous décrirons la méthode que nous avons suivie et les résultats que nous avons obtenus pour les sérums d'ictériques.

Les deux méthodes de dosage direct automatique que nous venons de citer permettent l'établissement du rapport d'estérification par dosage de cholestérol libre. Ce cholestérol libre est précipité sous forme de complexe par le digitonoside en présence de chlorure d'aluminium comme catalyseur. Les esters solubles du cholestérol sont séparés par centrifugation. Cette technique décrite par R. FEUTRY (5) nous a semblé peu pratique et relativement complexe. Elle nécessite en effet, plusieurs centrifugations et filtrations ainsi que l'emploi successif de quatre réactifs. Si elle est parfaitement correcte au point de vue chimique, les nombreuses manipulations qu'elle nécessite augmentent les causes d'erreur. Malgré ses inconvénients, elle est préconisée par BOY qui a décrit la façon de l'inclure dans les séries de dosage de cholestérol total selon la méthode de PEARSON LIEBERMANN. Il est possible d'obtenir le même résultat avec le méthode de HUANG LIEBERMANN. Dans les deux cas, un catheter spécial est ajouté au manifold. Ce catheter aspire le complexe de Windaus qui est redissous en milieu acétique. Il est en effet impossible d'aspirer le sérum par le même catheter chargé de conduire un liquide fortement acide.

Il est nécessaire d'utiliser un étalonnage spécial de solution acétique de cholestérol pour se placer dans des conditions de lecture

identique.

Nous devons citer le travail de BENSA (6) qui avait résolu le problème du dosage du cholestérol libre par voie automatique. Son étude s'appliquait à la première méthode semi automatique après extraction par l'alcool isopropylique et coloration de Zak. Cet auteur avait adapté la méthode de JEROME et FONTY (7).

En 1965, une note présentée par L. MOLINE au Symposium Technicon (8) exposait une nouvelle méthode d'évaluation du rapport d'estérification.

Ce procédé valable pour les techniques manuelles s'est révélé très aisément adaptable à la voie automatique. Le principe en est simple.

Il consiste à rechercher un réactif satisfaisant à une double exigence, d'une part, dissoudre parfaitement le digitonoside et d'autre part, ne causer aucune dénaturation des protides. Le méthanol additionné d'un dizième en volume de soude décinormale donne de bons résultats. Ce mélange permet de dissoudre 500 mg pour cent de digitonoside, proportion classique pour presque toutes les méthodes qui utilisent cette substance dont la propriété séparatrice est connue depuis les travaux de WINDAUS. La précipitation du cholestérol libre s'effectue directement en milieu sérique après mélange rapide de 0,2 ml du réactif à 1 ml de sérum. Un précipité floconneux se forme et finit par se rassembler au fond du tube. Le sérum surnageant est clair, sa composition protidique est identique à celle d'un témoin effectué en utilisant le même réactif privé de digitono-

side.

Après avoir prélevé ce surnageant, il est aisé de pratiquer l'évaluation du taux des esters par méthode directe.

Méthode manuelle et voie automatique ne diffèrent pas dans leur principe.

Un premier temps a permis d'éliminer le cholestérol libre sous forme de précipité, un second temps aboutit à la réaction de coloration. L'auto-analyseur n'intervient que pour effectuer avec précision, régularité et facilité cette dernière opération.

-:-

Le plan de cet exposé est le suivant :

1°- ETUDE DES REACTIFS

2°- MODE OPERATOIRE

3°- DISCUSSION ET RESULTATS

I°- ETUDE DES REACTIFS

-:-

R N° I (M.A.)

Méthanol pour analyse Merck (n°6009) ... 90 ml
OH Na 0, I N (Tritisol) ... 10 ml

R N° 2 (M.A.D.)

Peser 0,5 g de Digitonoside - faire dissoudre dans 100 ml du R N°I.

La dissolution est totale en 5 à 10 minutes en agitant par barreau magnétique rotatif.

La conservation est limitée à 1 mois. On évitera cependant des insuccès en utilisant le Méthanol pour analyse Merck (Référence n°6009) qui donne un seul pic d'enregistrement sur le chromatogramme en phase gazeuse. Ce n'est pas toujours le cas avec le Méthanol fourni par d'autres marques lorsqu'il est soumis à la même épreuve. Nous avons pu en faire l'expérience. La figure n°1 montre l'enregistrement du Méthanol Merck et tracé obtenu par un méthanol d'autre origine.

R N° 3 réactif selon HUANG

Acide acétique anhydre pur pour analyse ... 500 ml
Anhydride acétique pur pour analyse 1000 ml

Sulfate de sodium anhydre pur ..... 33 g
Acide sulfurique (d = 1,83) pur
pour analyse ..... 165 ml

Mélanger les deux premiers constituants, ajouter le SO_4Na_2 et verser lentement l'acide sulfurique en agitant doucement jusqu'à dissolution complète du sel.

Conservation à +4° un mois environ, un léger jaunissement n'altère pas les propriétés chimiques du liquide.

-:-

Chromatographie en
phase gazeuse

2°- MODE OPERATOIRE

-:-

Placer à la pipette de précision dans deux tubes de Kahn :

0,2 ml du R N°I (M.A.)
0,2 ml du R N°2 (M.A.D.)

On évitera de contaminer le Réactif N°I par le Réactif N°2.

Ajouter 1 ml de sérum (pipette à écoulement total) dans chaque tube en projetant le sérum au fond du tube. Le mélange doit être immédiat. Boucher hermétiquement avec des capsules en plastique. Mélanger par retournement en évitant les mousses. Incuber les deux tubes de Kahn au Bain Marie à 37°: 30 minutes minimum. Ce temps d'incubation peut être prolongé pendant plusieurs heures sans inconvénient.

Centrifuger (les deux tubes s'équilibrant) à 2500 tours minute pendant 5 minutes environ.

Après la centrifugation une certaine quantité de surnageant sera pipeté dans le tube ayant reçu le R N°2 et déposée dans un godet sur le distributeur d'échantillons. Le godet suivant recevra le contenu du premier tube (R N°I).

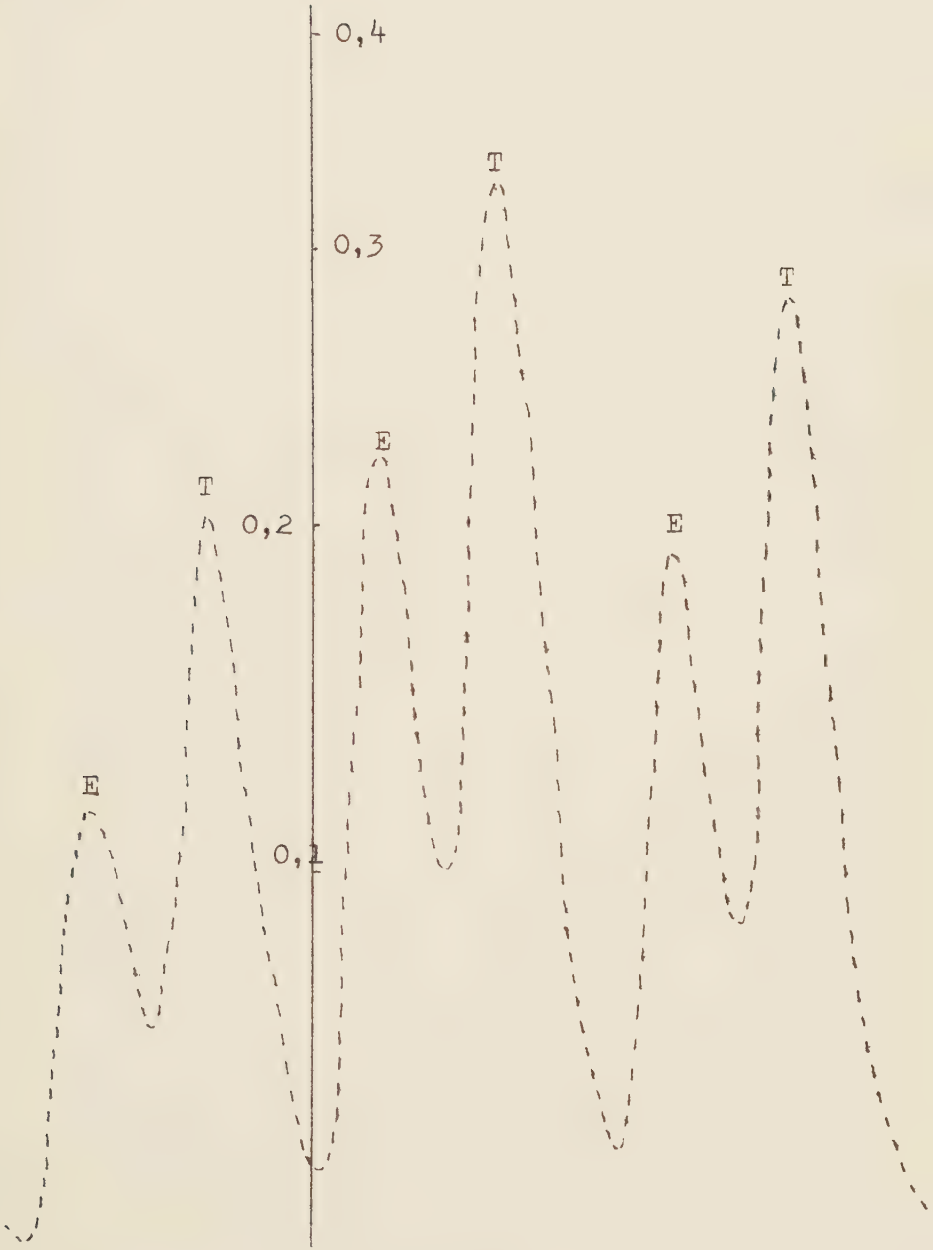
La vitesse de défilement est de 60 pipet-

tages à l'heure. Un emplacement vide sépare les deux godets et deux emplacements vides séparent les couples. On obtient la suite 1.0.1.1.1.2.0.2.0.0.3.1.3. etc...

Cette façon de procéder permet d'obtenir un tracé parfaitement lisible.

La figure n°2 montre la succession de 3 déterminations différentes. Pour chacune des trois déterminations, le premier pic correspond au dosage des esters, le second au témoin cholestérol total.

-:-



$\frac{E}{T} = 0,60$ $\frac{E}{T} = 0,67$ $\frac{E}{T} = 0,68$

MONTAGE DU MANIFOLD

-:-

Il y a très peu de différence entre le montage que nous avons utilisé et la description donnée par ETIENNE PAPIN et RENAULT.

Il est nécessaire de préciser les points suivants :

Les tubes de pompe choisis sont :

1°- 0,020 ..... sérum
2°- 0,llo ..... réactif de Huang
3°- 0,073 . air

sauf les tubes de pompe en Tygon, tout le montage est réalisé en liaison Acidflex ou en verre. L'injection du sérum s'effectue par un T capillaire précédé d'une aiguille creuse en acier inoxydable anti retour. Cette pièce doit être vérifiée avant chaque séance de dosage.

Nous avons placé une bobine de mélange horizontale, immédiatement après le confluent des trois tubes de pompe. Le chauffage du mélange s'effectue dans la bobine du BM usuel de l'auto analyseur dont la température est réglée à 60°.

L'expérience nous a montré que cette température était la plus favorable pour obtenir la meilleure coloration ainsi qu'une redissolution parfaite des protides.

La distance entre le BM et la cuve du colorimètre est la plus courte possible. Ce trajet ne comporte pas de bobine de mélange. Un couple de filtre rouge 660mμ est adapté au colorimètre. Nous utilisons le papier d'enregistrement semi logarithmique pour faciliter la lecture des résultats. Le schéma n°2 (bis) montre le diagramme des flux utilisés.

Etalon

On emploie les sérums reconstitués (Alcasynthèse) pour obtenir trois valeurs croissantes.

On préparera :

- Versatol alterné pur
- Mélange à partie égale Sérachol et Versatol A
- Sérachol pur

Pour chaque sérum, il convient d'effectuer:

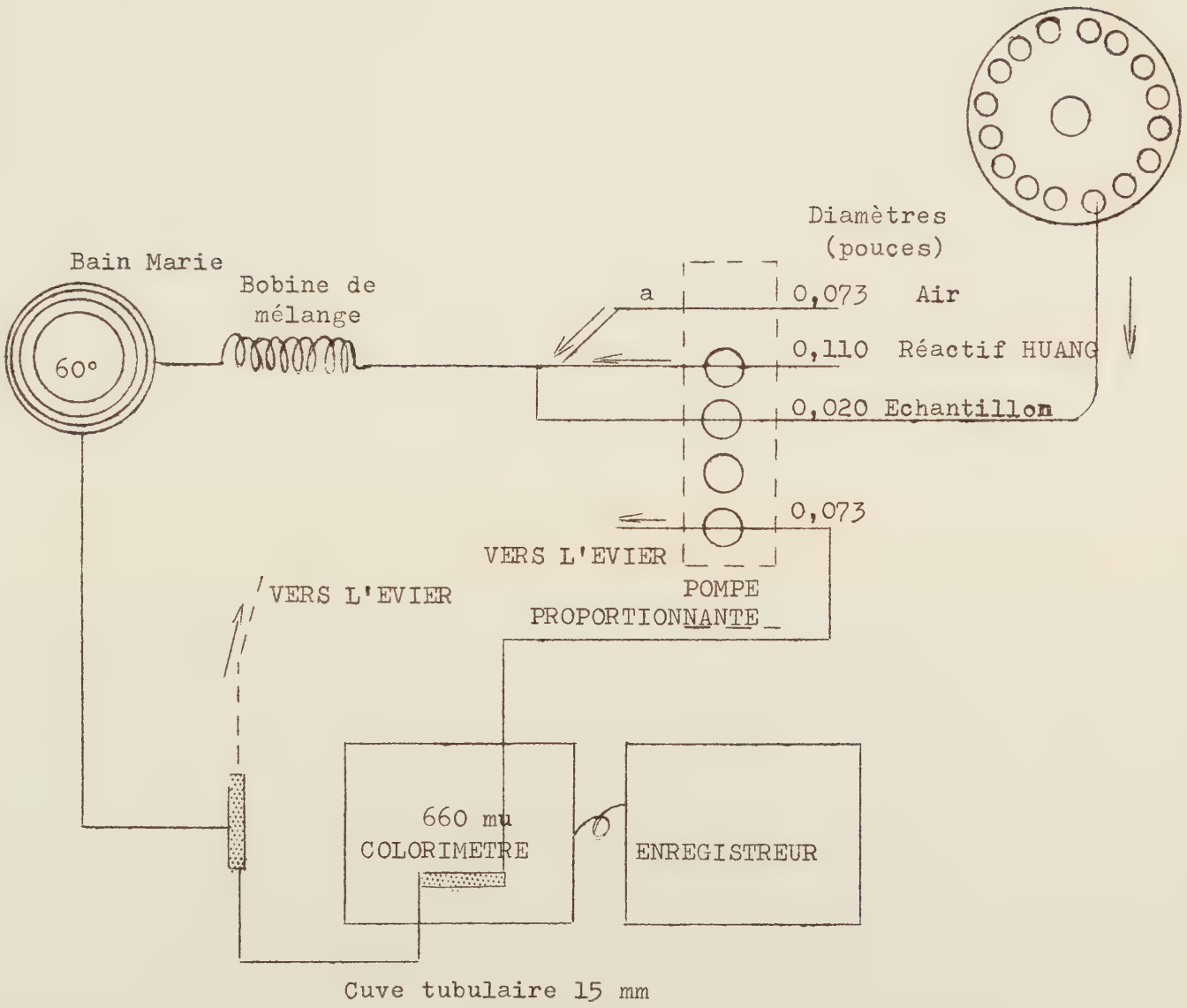
1°- le dosage du cholestérol total
2°- le dosage des Esters (M.A.D.) R N°2
3°- le dosage témoin correspondant au cholestérol total (M.A.) R N°I

On peut calculer directement le rapport d'estérification :

$$\frac{E}{T} = \frac{\text{Do Ester N°2}}{\text{Do Témoin N°3}}$$

Ce mode opératoire permet le dosage successif des esters et du cholestérol total à l'aide de l'appareil automatique. Cependant il est indispensable de préciser les points suivants :

I°- Sérum
2 ml sont utiles, au minimum on peut opérer



MONTAGE DE L'AUTOANALYZER (Lieberman-Huang)

sur 1,5 ml en plaçant :
0,2 de MAD pour 1 ml de sérum et
0,1 de MA pour 0,5 ml de sérum.

L'échantillon sera réchauffé à 37° avant l'utilisation, surtout si le prélèvement a séjourné quelque temps au réfrigérateur.

2°- Le mélange du réactif et du sérum

DOIT ETRE IMMEDIAT sinon on obtient une dénaturation protidique des premières gouttes entrant en contact avec le Méthanol. Cette dénaturation est évitée en utilisant des pipettes à écoulement total et en projetant vivement le sérum au fond du tube.

3°- La température et la viscosité

interviennent dans la rapidité de formation du complexe de Windaus, il est nécessaire de laisser la réaction incuber suffisamment longtemps.

4°- Le BM ne doit pas être agité ou subir de vibration. On évitera d'utiliser pour un autre dosage le BM pendant la précipitation. Il ne faut pas secouer le tube que l'on placera avec précaution dans la centrifugeuse. L'arrêt s'effectuera sans freinage son action risquerait de détacher le précipité.

Si, par erreur, le précipité est secoué et remis en suspension, il est absolument IMPOSSIBLE d'obtenir une nouvelle fois sa séparation.

5°- En effectuant un grand nombre de dosages, on s'aperçoit que la précipitation du complexe de Windaus, quelquefois, ne s'effectue pas.

Nous n'avons pas d'explication valable de ce fait. On peut penser qu'il s'agit d'échantillon dont la viscosité est élevée ou dont le taux de cholestérol libre est très faible. Les sérums normaux donnent toujours un précipité correct.

6°- Il est recommandé de traiter les tubes servant au dosage des esters exactement de la même façon que le tube témoin cholestérol total, qu'il s'agisse de la centrifugation, du bouchage et du rebouchage.

Ces quelques précisions sur le mode d'emploi résument les principales difficultés que nous avons rencontrées au cours de notre étude.

RESULTATS

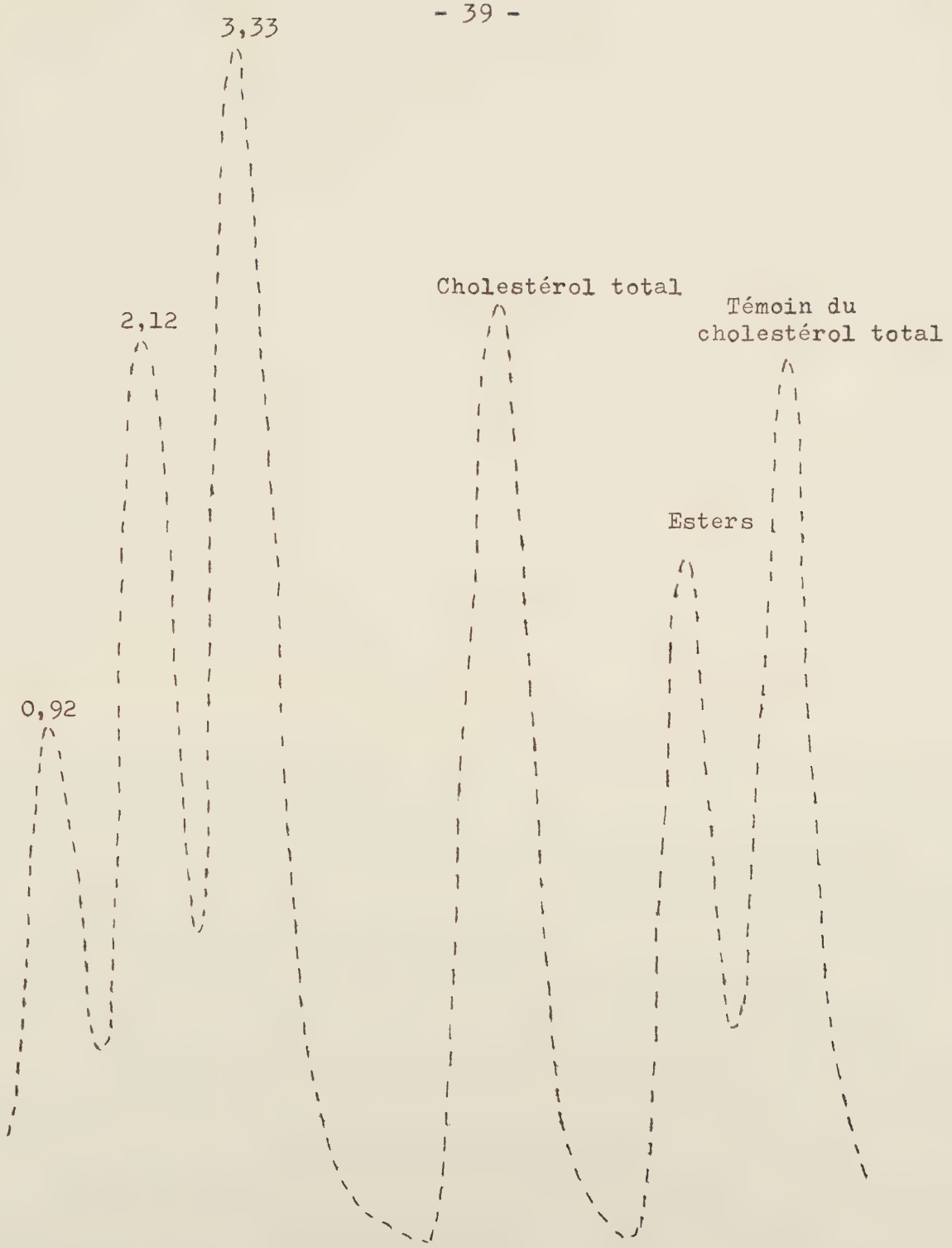
L'évaluation du rapport E/T a été pratiquée sur 36 sérums provenant de sujets sains (origine : poste de transfusion - donneurs de sang à jeûn). Pour les cas envisagés la moyenne arithmétique est 0,71 (valeurs extrêmes E/T 0,61 et 0,78 - Pour la même série la moyenne du taux de cholestérol total est 2,10 g/l).

Les résultats obtenus dans un laboratoire d'hôpital, sans aucune sélection particulière des examens entre les services, établit sur 46 déterminations une moyenne arithmétique de 0,60 pour le rapport E/T (valeurs extrêmes E/T 0,30 et 0,84 - valeurs extrêmes cholestérol total pour la même série 0,90 et 3,80 g/l).

La figure n°2 (ter) montre une succession de six pics d'enregistrement qui correspondent à :

1°- 0,92 g/l étalon cholestérol total
2°- 2,12 g/l étalon " "
3°- 3,33 g/l étalon " "
4°- dosage du cholestérol total 2,25 g/l
5°- ester du même sérum Do = 24
6°- témoin cholestérol total du même sérum
Do = 34 E/T = 0,70

-:-


3,33
2,12
0,92
Cholestérol total
Témoin du
cholestérol total
Esters

3°- DISCUSSION

-:-

Les principaux points qui ont fait l'objet de nos observations sont les suivants :

1°- Mode de formation du Complexe de Windaus en milieu sérique
2°- Stabilité du précipité après centrifugation
3°- Etude de la cinétique colorimétrique de la réaction de Liebermann Huang dans le cas du cholestérol libre et du cholestérol total
4°- Comparaison de la coloration de Liebermann Huang et de la coloration de Zak et Zlatkis appliquée à la détermination du rapport d'estérification après précipitation du cholestérol libre dans le sérum.
5°- Etude de la reproductibilité de la méthode.
6°- Détermination de l'erreur introduite par les interférences dues à la bilirubine sérique.
7°- Comparaison de la méthode étudiée avec d'autres techniques de dosage.

o

I°- Mode de formation du Complexe de Windaus en milieu sérique

Dès que le sérum est mis au contact du Réactif N°I on observe une opalescence qui s'accroît rapidement. Nous avons pu faire un enregistrement néphélométrique continu du phénomène avant que ne débute la floculation spontanée. Nous avons opéré à 23° à l'aide de l'enregistreur automatique. La densité optique maximum est atteinte au bout de 30 minutes.

Le graphique n°3 donne un exemple de courbe néphélométrique. L'optimum thermique est situé aux alentours de 37-40°. A 4°, il n'y a pas de sédimentation spontanée, alors que ce phénomène débute à 37° une heure environ après le mélange au sérum du Méthanol alcalin digitonoside.

Le but de la recherche était de déterminer le temps d'incubation nécessaire en pratique courante.

Dans les conditions décrites pour l'exécution de la réaction, 30 minutes donnent une marge de sécurité suffisante pour obtenir une précipitation de tout le cholestérol libre.

Le tableau n°1 montre les différences qu'il peut y avoir entre 7 dosages successifs sur un même sérum. Les valeurs trouvées par centrifugation sont identiques à celles obtenues par sédimentation spontanée.

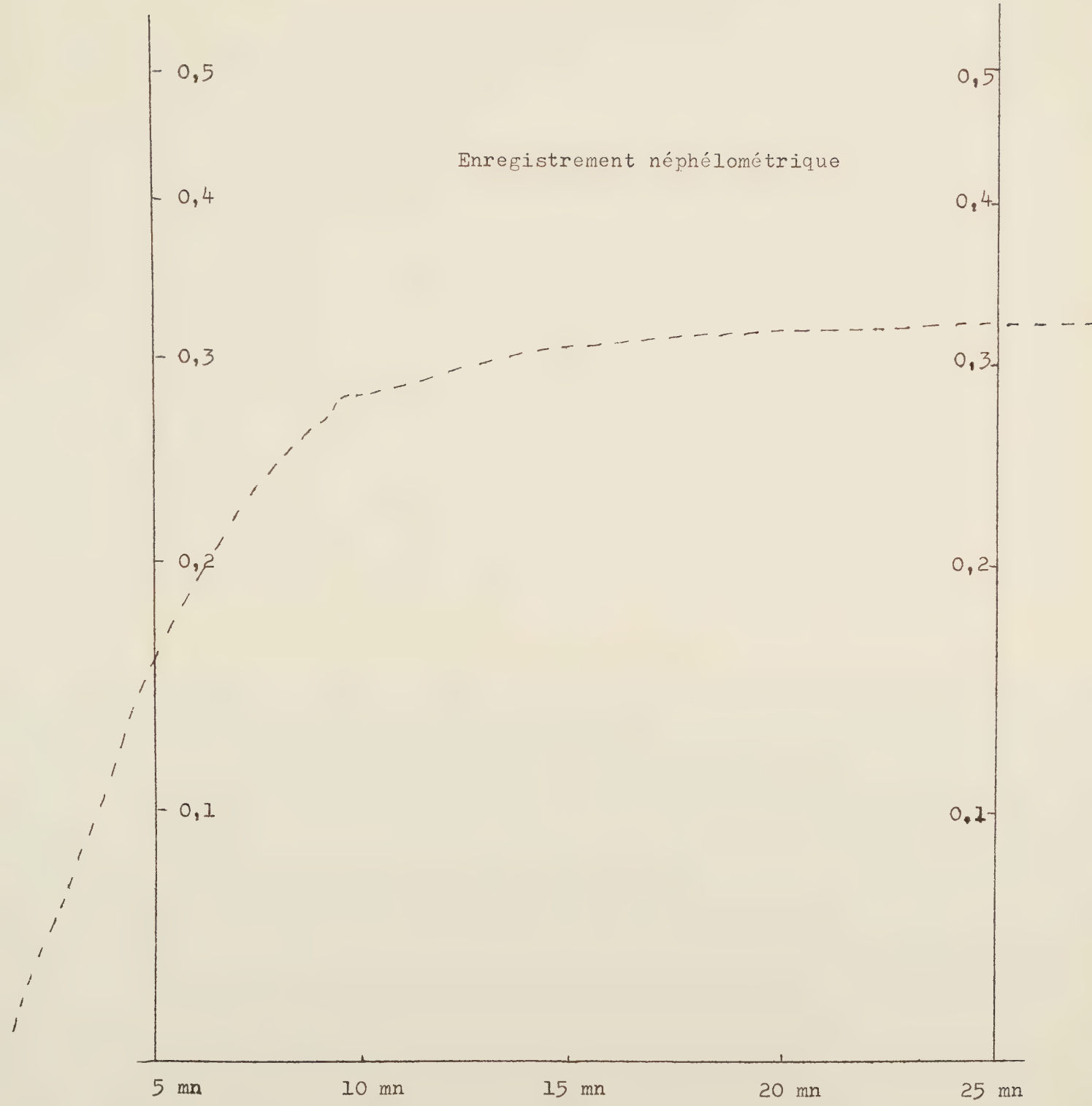

Enregistrement néphélométrique
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
5 mn
10 mn
15 mn
20 mn
25 mn

Tableau 1

	Temps d'incubation (mn)	Centrifugation 2500 tours/mn 5 mn	D.Optique
I	10	"	18
2	20	"	20
3	30	"	17
4	40	"	18
5	60	"	17
6	80	sédimentation spontanée	17
7	120	sédimentation spontanée	17

Il semble donc inutile de dépasser une demie heure d'incubation si l'on désire pratiquer le dosage des esters sur le surnageant.

2°- Temps de contact entre le précipité et le liquide surnageant

Nous avons vérifié l'influence que pouvait avoir sur la valeur de la réaction de Liebermann un temps de contact plus ou moins prolongé entre le sérum et le précipité.

Trois séries de mesures ont porté sur un même sérum. Les tableaux montrent successivement les résultats de la coloration immédiate, après un délai de 4 heures, et enfin après 24 heures de conservation à 4°C.

Tableau II - COLORATION IMMEDIATE

N°	Cholestérol estérifié	Cholestérol total
I	25	42
2	26	42
3	25	43
4	25	41
5	25	42
6	25	42
MOYENNE	25	42

C E = 1,50 g/l C T = 2,52 g/l E/T = 0,59

Tableau III - COLORATION APRES 4 h

N°	Cholestérol estérifié	Cholestérol total
I	27	41
2	26	41
3	26	41
4	25	41
5	24	41
6	17	41
MOYENNE	26	41

C E = 1,56 g/l
C T = 2,46 g/l
E/T = 0,59

Tableau IV - COLORATION APRES 24 h

N°	Cholestérol estérifié	Cholestérol total
I	23,5	43
2	24,5	43
3	24,5	40
4	24,5	40
5	25	41
6	25	43
MOYENNE	24,5	42

C E = 1,48 g/l C T = 2,59 g/l E/T = 0,59

Les résultats n'ont pratiquement pas varié et la valeur E/T est restée constante.

Plusieurs heures peuvent donc séparer la précipitation du complexe de la coloration.

o

3°- Cinétique de la réaction de Liebermann

Dans les conditions où le dosage est effectué, il n'existe aucune différence sensible entre les deux déterminations colorimétriques l'une représentant le taux de cholestérol total, c'est-à-dire la fraction libre plus les esters, l'autre les esters isolément. Nous avons l'enregistrement cinétique de la coloration, le maximum était atteint après des temps identiques, aussi bien

pour le dosage de cholestérol total que pour les esters ou le témoin du cholestérol total.

Le graphique n°4 montre la cinétique de la coloration de Huang Liebermann. L'enregistrement n'a pu être évidemment réalisé que par la technique manuelle Liebermann Huang (9). Trois courbes ont été enregistrées à partir de la même origine :

1 - cholestérol total
2 - témoin cholestérol total
c'est-à-dire sérum additionné dans la proportion de 0,2 de Réactif N°I pour 1 ml
3 - ester du cholestérol
dans le cas envisagé, le rapport d'estérification est égal à 0,65.

4°- Comparaison de la coloration de Liebermann Huang et de la coloration de Zak et Zlatkis appliquée à la détermination du rapport d'estérification après précipitation du cholestérol libre.

Le complexe de Windaus étant éliminé par centrifugation nous avons fait deux prises d'essai sur le même échantillon. La première a été traitée selon la micro-méthode modifiée d'après ZLATKIS, ZAK et BOYLE (1), la seconde coloriée selon la méthode de LIEBERMANN. Le graphique n°5 met en évidence, l'indépendance du rapport E/T vis-à-vis des deux colorations étudiées.

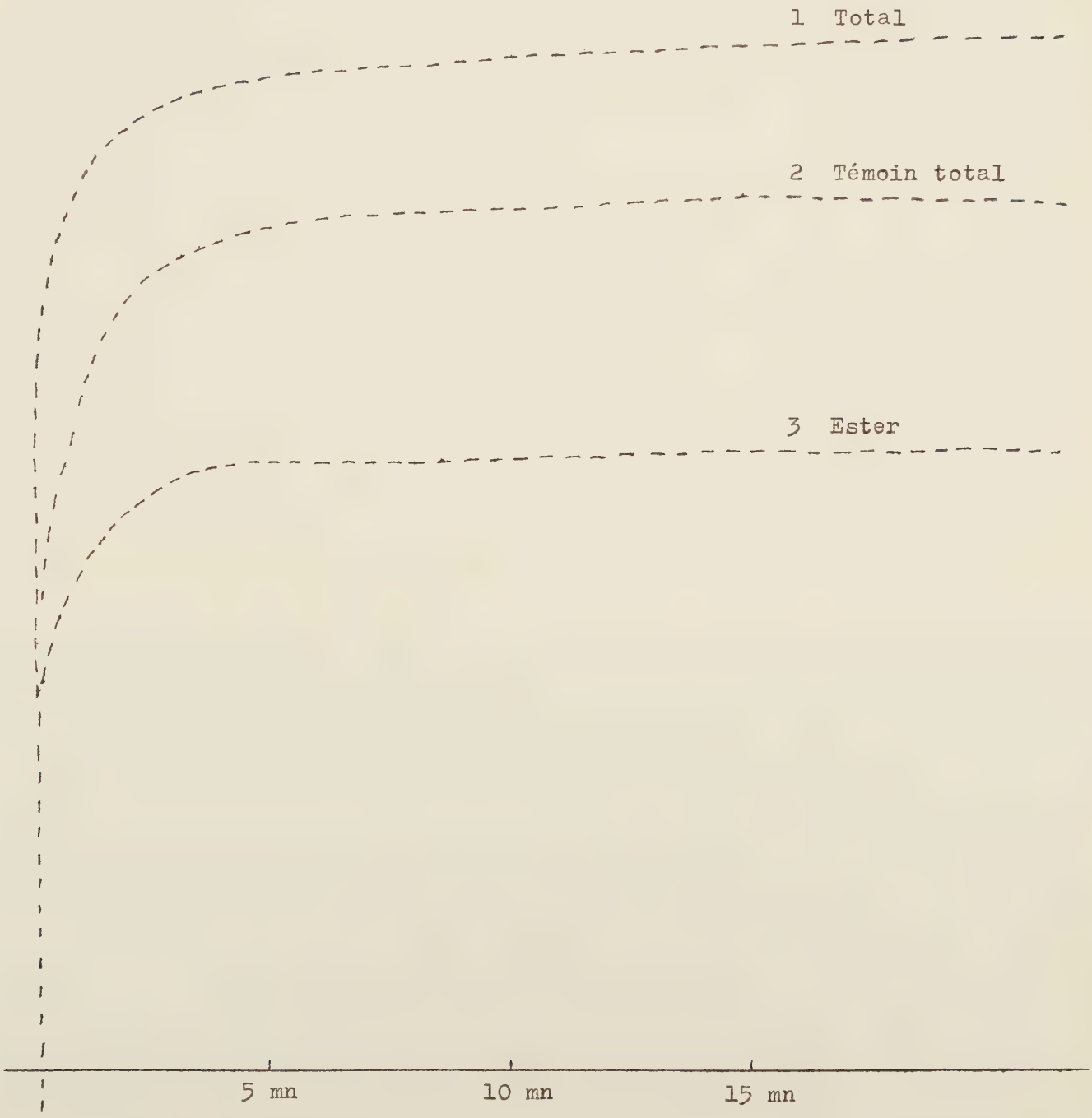
5°- Reproductibilité

Nous avons d'abord essayé la reproductibilité par la méthode manuelle, elle était fort satisfaisante. Nous avons fait de nombreux essais qui nous ont semblé concluants.

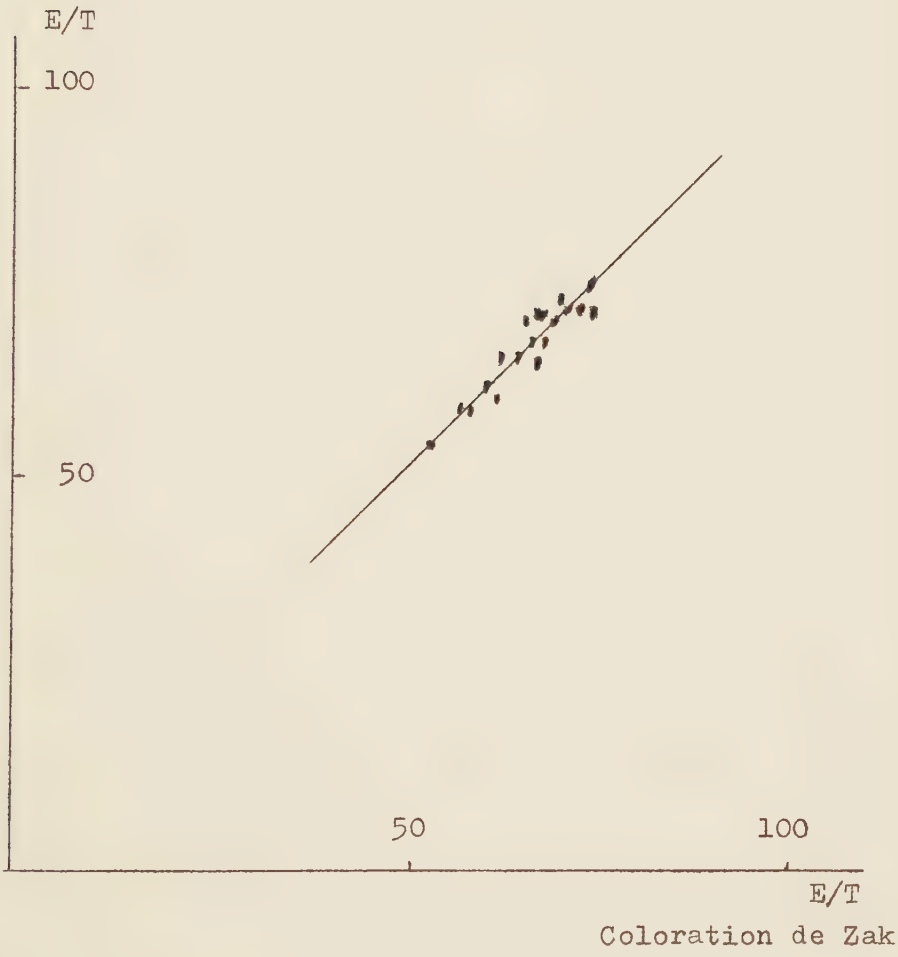
L'étude par l'auto analyseur a confirmé notre impression en nous permettant d'exécuter facilement des séries importantes.

Le tableau suivant rapporte les résultats de 18 dosages pratiquées sur un même sérum :

Cinétique des réactions colorées



Coloration de Lieberman-Huang



Coloration de Zak

Méthode de HUANG à l'auto analyseur essai sur un même échantillon

Cholestérol estérifié	Cholestérol total
23	29,5
22	29
23	29
23,5	29
23	29
22,50	29
22	29
22	29
22	29
22	29
22	29
21,50	29
22,50	29
22	29
22	29
22	29
22	29
22	29

MOYENNE 22,30 ± 1 29,2 ± 0,5

ERREUR RELATIVE 4,5 % 1,7 %

C.E. 1,35 g/l C.T. 1,80 g/l E/T 0,76

6°- Interférences de la bilirubine

Dans le cas de sérums normaux, la bilirubine n'intervient pas. Pour les sérums fortement ictériques, une erreur par excès est introduite par transformation de la bilirubine en biliverdine. La biliverdine donne une coloration presque identique à celle de Liebermann.

La méthode décrite par ETIENNE, PAPIN et RENAULT (9) prévoit l'utilisation d'un filtre gélatine jaune orangé (Wartern n°15) pour supprimer l'absorption propre de la bilirubine non transformée. Ayant modifié, la technique originale, nous n'avons pas trouvé d'intérêt particulier à ce dispositif. Le temps de contact étant de 8 minutes à 60°, toute la bilirubine est vraisemblablement transformée.

Nous pensons qu'il est intéressant de noter que J. BOY et BONAFE préconisent d'utiliser l'air passé sur pyrogallol ou de l'azote pour effectuer le bullage de l'appareil. Cette précaution permettant d'éviter l'oxydation de la bilirubine. Nous n'avons pu vérifier l'efficacité de ce perfectionnement qui s'adresse à la technique selon PEARSON.

Dans les conditions où nous avons travaillé, la bilirubine introduite par les sérums d'ictériques nous a semblé être la principale cause d'erreur.

En effet, le dosage des esters et du cholestérol total s'effectuent sur le même sérum, une erreur identique par excès sera ajoutée au dénominateur et au numérateur du rapport. Par exemple, pour un sérum contenant

une quantité physiologique de bilirubine (12 mg), les chiffres suivants sont obtenus: Do total = 30 Do ester = 20, le rapport d'estérification est de 0,66. Le même sérum additionné de bilirubine dosant au total : 50 mg de bilirubine par litre, donnera les lectures suivantes : Do total = 35 Do ester = 25 Rapport = 0,71.

On voit que 40 milligrammes de bilirubine entraînent une erreur non négligeable du rapport d'estérification . Nous avons cherché en nous plaçant strictement dans les conditions du dosage à déterminer cette erreur. Au lieu de faire des dosages successifs, nous avons préféré employer la méthode de concentration exponentielle continue.

Le dispositif utilisé consiste à prélever 0,159 ml/minute d'un sérum normal contenant 12 mg par litre de bilirubine. Le volume de l'échantillon (5 ml) reste fixe : une quantité strictement égale à celle qui est pompée étant ajoutée d'une façon continue.

Le liquide servant à assurer l'égalité du volume est le même sérum fortement enrichi en bilirubine (200 mg). Si l'expérience dure assez longtemps, la concentration finale de l'échantillon sera très proche de 200 mg. Dans le cas de concentration exceptionnellement continue, la formule donnant la concentration C au temps t est :

$$C = Co\ (I - e^{kt})$$

dans laquelle K a pour valeur $\frac{x}{v}$ v représentant le volume fixe de l'échantillon progressivement enrichi en bilirubine soit 5 ml

x est égal au volume ajouté et prélevé soit 0,15 9 ml/minute.

L'enregistrement n°6 montre le début du tracé obtenu par cette méthode. L'enrichissement progressif a débuté trois minutes après le début de l'expérience. En utilisant ces données, nous avons pu tracer une courbe de correction qui n'est valable que dans les conditions du dosage.

Il suffit de retrancher à la densité optique obtenue par méthode directe, la valeur exprimée en densité optique correspondant au taux de bilirubine. Voir graphique n°7. Pour obtenir une correction satisfaisante, il est donc nécessaire de doser la bilirubine totale du sérum.

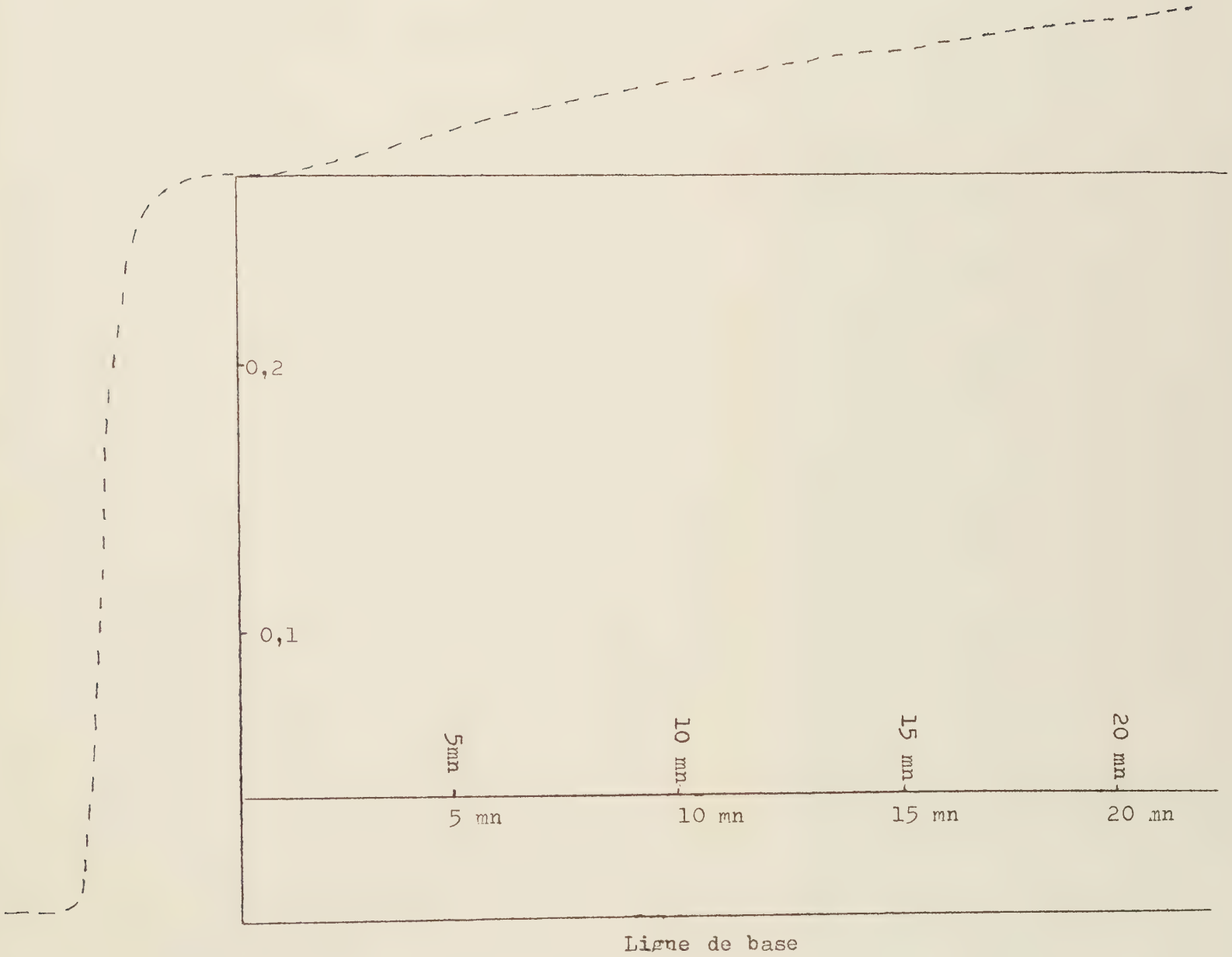
7°- COMPARAISON avec d'autres méthodes de dosage

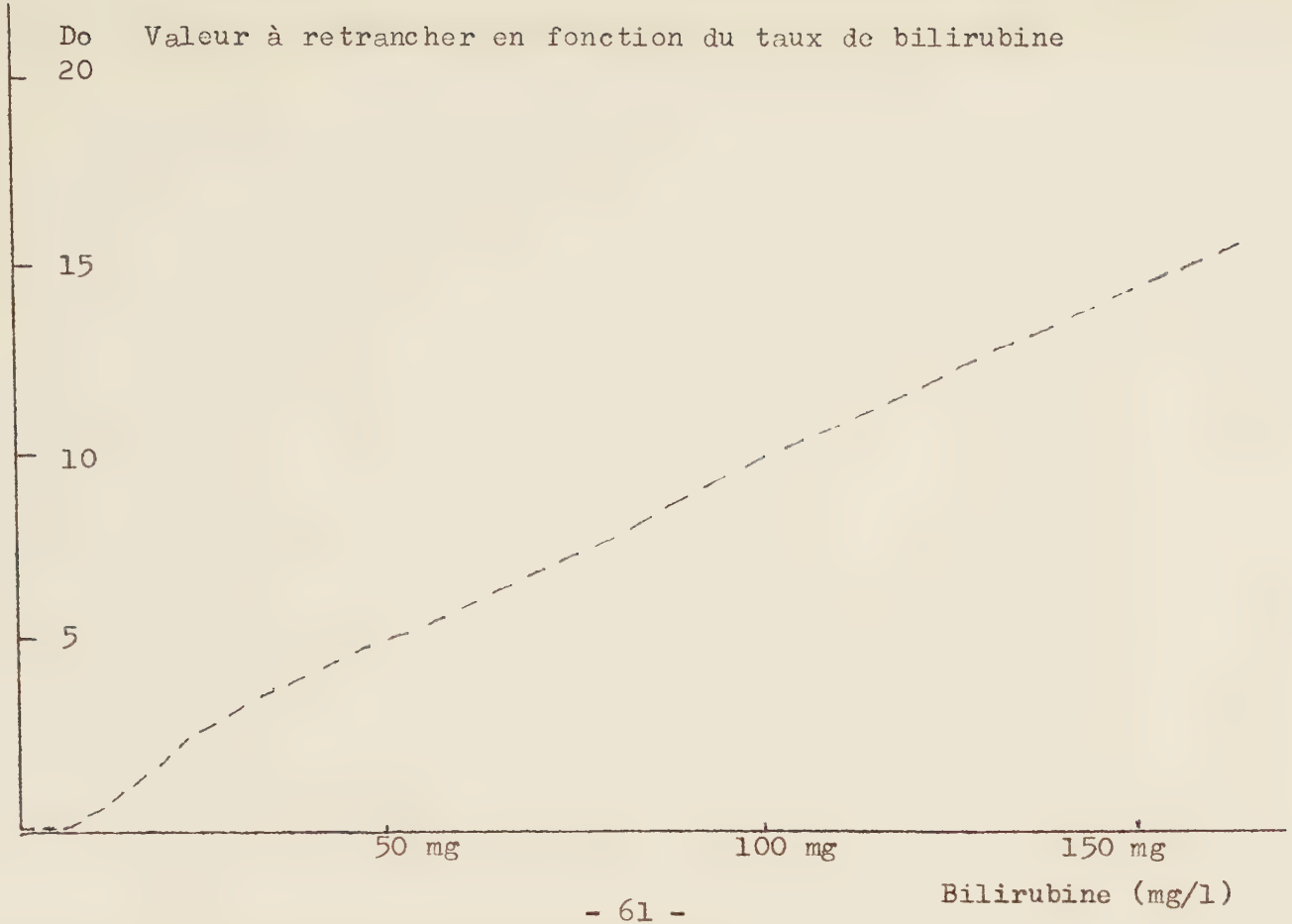
La méthode qui fait l'objet de notre étude a été comparée avec deux techniques.

La première a été publiée en 1962 (10), sous le titre de "Microméthode nouvelle de dosage du cholestérol libre et du cholestérol total directement sur le sérum sanguin". Son principe est lié à la relation associant la température et le développement de la réaction colorée par le réactif acéto-sulfurique au perchlorure de fer.

Les colorations du cholestérol libre et du cholestérol estérifié se produisent simultanément vers 65 ° ; elles se trouvent en revanche dissociées dans le temps aux températures inférieures. L'évaluation du rapport d'estérification peut se faire en opérant à

Concentration exponentielle
en bilirubine




Do
Valeur à retrancher en fonction du taux de bilirubine
20
15
10
5
50 mg
100 mg
150 mg
Bilirubine (mg/l)

la température de 20° (cholestérol libre), puis à la température de 65° (cholestérol estérifié).

Nous avons choisi de comparer la technique que nous proposons avec cette méthode parce qu'elle n'utilise pas le digitonoside pour la séparation du cholestérol libre, ni la coloration de Liebermann. Leur seule caractéristique commune est de s'effectuer l'une et l'autre sur le sérum sans extraction préalable.

Le graphique n°8 compare les résultats obtenus par ces deux méthodes, pour 15 sérums.

Nous avons comparé ensuite la méthode étudiée, avec le dosage du cholestérol libre et du cholestérol estérifié après séparation par chromatographie sur alumine.

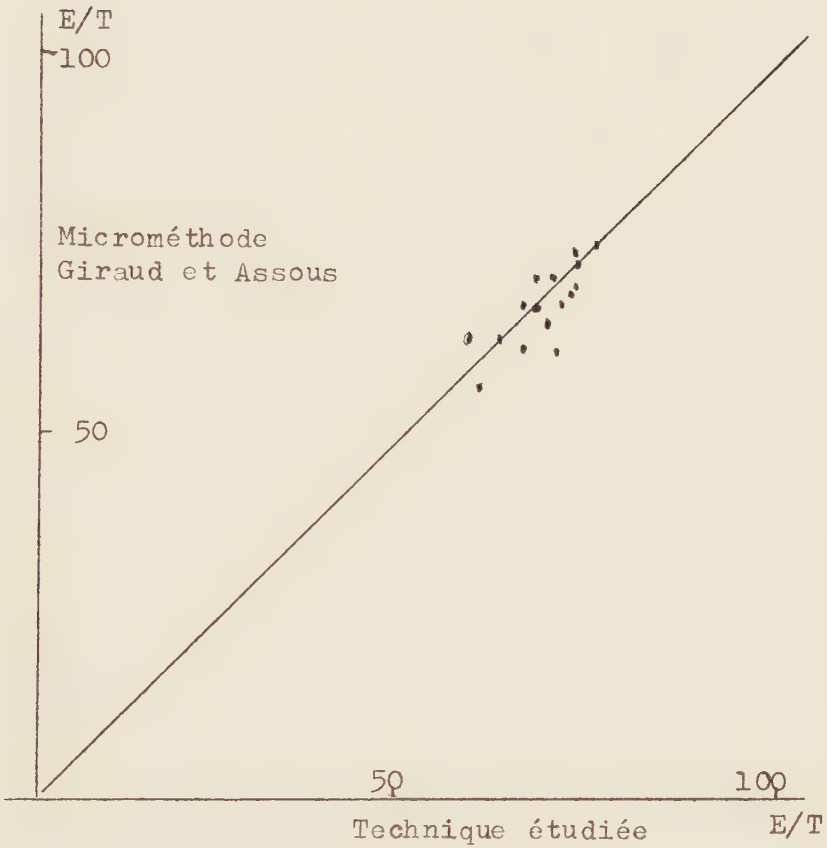
Chacune des fractions est dosée selon la méthode de LIEBERMANN par rapport à un étalon de même nature.

27 sérums ont été analysés par les deux méthodes dans deux laboratoires différents. Le graphique 8 bis compare les résultats obtenus. Il est intéressant de donner un tableau comparatif de ces mêmes résultats disposés suivant le taux croissant de cholestérol, évalué par la méthode chromatographique (11). Le résultat le plus faible est 1,30 g/l le plus élevé 2,95 g/l. Les rapports extrêmes sont 0,42 et 0,74. Les sérums proviennent de laboratoires d'hôpitaux : il s'agit d'examens demandés par des médecins pour des malades externes ou hospitalisés.

Nous constatons que pour le sérum présen-

tant le taux de cholestérol libre le plus faible (0,55 g/l) il n'a pas été possible d'obtenir la floculation du complexe de Windaus. Le dosage n°3 montre seul une différence importante : rapport d'estérification de 0,53 pour la chromatographie sur alumine et de 0,73 pour la méthode étudiée. Il n'a pas été possible de vérifier ce résultat aberrant, la quantité de sérum étant insaffisante.

La concordance est à peu près correcte pour tous les autres résultats.

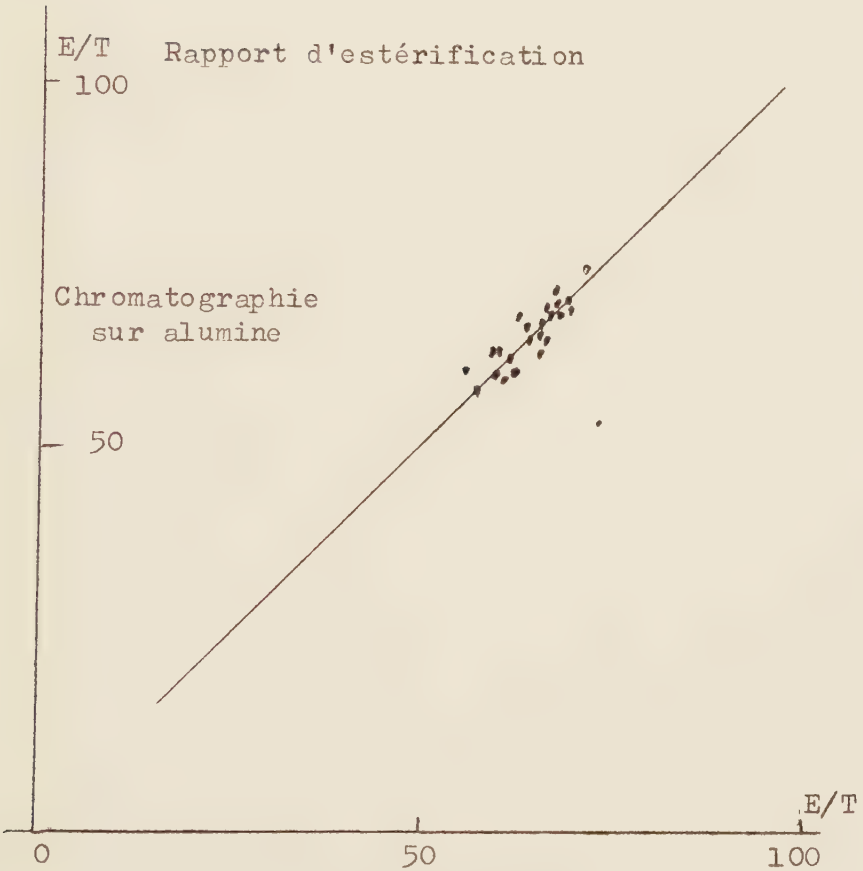

E/T
100
Microméthode
Giraud et Assous
50
50
100
Technique étudiée
E/T

Sérums	Chromatographie		Méthode proposée	
N°	C.T.	Rapport	C.T.	Rapport
1	1,30	0,42	nul	1,20
2	1,35	0,69	0,68	1,42
3	1,65	0,53	0,74	1,66
4	1,65	0,63	0,60	1,56
5	1,80	0,63	0,60	1,68
6	1,85	0,68	0,64	1,95
7	1,90	0,65	0,66	2,08
8	2,15	0,68	0,67	2,34
9	2,15	0,67	0,66	2,35
10	2,20	0,65	0,67	2,30
11	2,25	0,63	0,67	2,30
12	2,30	0,63	0,60	2,86
13	2,30	0,70	0,68	2,50
14	2,35	0,62	0,62	2,15
15	2,35	0,63	0,61	2,20
16	2,35	0,68	0,68	2,14
17	2,40	0,62	0,60	2,80
18	2,45	0,68	0,70	2,24

Sérums	Chromatographie		Méthode proposée	
N°	C.T.	Rapport	C.T.	Rapport
19	2,60	0,67	0,67	2,64
20	2,70	0,68	0,64	2,50
21	2,70	0,67	0,65	2,68
22	2,75	0,69	0,68	2,40
23	2,80	0,74	0,72	2,95
24	2,80	0,68	0,70	2,50
25	2,95	0,70	0,67	2,74
26	2,95	0,69	0,69	2,80
27	2,95	0,68	0,69	2,85

-:-

Comparaison de la méthode étudiée (MAD)
et de la méthode chromatographique



MA Lieberman Huang

Nous résumerons les points principaux de cette discussion.

Il s'agit d'un dosage direct sans extraction lipidique. On retrouve donc les inconvénients communs aux différentes techniques directes qui ont été proposées principalement l'interférence de la coloration de Liebermann et de la bilirubine.

Pour ce point précis, la méthode de correction utilisée dans ce travail s'avère efficace mais nécessite évidemment le dosage de la bilirubine totale pour tout sérum ictérique. Cette obligation fait perdre en partie le bénéfice du gain de temps occasionné par la précipitation directe du complexe de Windaus.

On peut critiquer également la composition du réactif qui contient de la soude. On pourrait craindre qu'une certaine quantité d'ester soit saponifiée. La méthode conduirait ainsi à une erreur par défaut pour le dosage des esters du cholestérol. Nous n'avons pu expérimenter directement, il nous semble cependant, que la quantité de soude introduite dans le réactif est extrêmement faible et correspond à une solution centi normale. D'autre part, la quantité de réactif n'est que d'une partie pour 5 parties de sérum. Dans ces conditions, l'erreur entraînée par la saponification est conforme aux conclusions de l'article de TRAVERSE, LAVERGNE et DEPRAITERE (les incertitudes de la mesure du cholestérol total du sérum).

En sens inverse pour approuver entièrement la méthode, il faudrait être absolument certain que tout le cholestérol libre est précipité au cours de la réaction. Nous regrettons de ne pouvoir également apporter de preuve expérimentale directe.

On peut penser cependant que tout le cholestérol libre est bien précipité puisque les dosages effectués par chromatographie nous donnent les mêmes résultats que ceux obtenus par la technique qui fait l'objet de cette étude.

Par ailleurs, nous avons constaté que les sérums hyperlipémiques et certains sérums dont le taux de cholestérol est particulièrement faible ont donné des résultats décevants. Pour cette dernière catégorie, nous avons pu noter l'exactitude d'une remarque faite par M. BOUILLET (12). Il s'agit d'un défaut de l'analyse automatique qui ne permet pas d'atteindre le maximum de coloration pour les taux de cholestérol faible, inférieur à 1 g/l. Cette condition est quelquefois réalisée pour le dosage des esters, dont le taux est évalué alors avec une erreur par défaut. Il s'agit là d'un inconvénient propre à l'auto analyseur, la même critique ne s'applique pas à la méthode manuelle selon HUANG telle qu'elle a été codifiée par CROCKET (9).

Quant à la réaction de précipitation directe du complexe de Windaus sur le sérum, si l'on effectue un assez grand nombre de dosages, on s'aperçoit qu'elle est mise en défaut un certain nombre de fois pour des sérums de malades, jamais pour les sérums de sujets sains. On voit un trouble assez in-

tense se produire mais la sédimentation spontanée du complexe ne s'effectue pas. Nous n'avons pas trouvé d'explications valables pour ce fait, peut être intéressant en lui-même.

-:-

CONCLUSIONS

-:-

La méthode que nous avons étudiée possède une reproductibilité excellente. Il est certain qu'elle comporte un nombre très réduit de manipulations et que les réactifs sont stables. Sa rapidité d'exécution est un de ses avantages principaux. Les résultats obtenus sont comparables à ceux d'autres méthodes utilisant une technique différente pour séparer le cholestérol libre de la fraction estérifiée.

L'erreur due à l'interférence de la coloration par la bilirubine peut être éliminée dans le cas de sérum de sujets ictériques par un dosage de ce pigment suivi de l'application d'une règle précise de correction.

Cependant, la méthode n'est pas applicable aux sérums hyperlipémiques ou hémolysés, aux sérums dont le taux des esters du cholestérol est particulièrement bas.

En tenant compte des observations précédentes, la technique qui a fait l'objet de notre étude peut rendre des services dans la pratique journalière des analyses biologiques.

-:-

Vu :
Le Président :
Signé : J. POLONOVSKI

Vu :
Le Doyen :
Signé : G. BROUET

Vu et Permis d'Imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris :
Signé : Jean ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

-:-

(1) ZLATKIS A., ZAK B. et BOYLE A.
J. Lab. and Clin. Med. 1953, 41, 485.

(2) BOY, BONAFE et MAZET
Ann. biol. Chim., 1960, 10-12,

(3) ETIENNE G., PAPIN (J.P.) et RENAULT H.
Ann. Biol. Clin. 1963, 10-12, 851.

(4) HUANG T.C., WEFLER V. et RAFTERY A.
Clin. Chim. 1960-4-407.

(5) FEUTRY R.
Cholestérol libre. Méthodologie
Technicon.

(6) BENSA J.
Ann. Biol. Clin. 1963, 3-4, 303.

(7) JEROME et FOUTY
Ann. Biol. Clin. 1962, 1, 117.

(8) Compte-rendu Symposium Technicon,
Paris 1965.

(9) ETIENNE G., COTTET et CROCKETT
Ann. Biol. Clin. 1964, 22, 923.

(10) ASSOUS E.F. et GIRARD M.L.
Ann. Biol. Clin. 1962 10-12, 973.

(11) AGNERAY J., PUISEUX F., DOURIS R.G.
Ann. Biol. Clin. 1958, 16, 503.

(12) BOUILLET M.
Technicon information 1964, 5, 32.

-:-